

学校编码: 10384

分类号____密级____

学号: 24520081153436

UDC____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

抑癌基因 ARHI 在人胃癌的表达及其义

The significance and expression of tumor suppressor
gene ARHI in human gastric cancer

唐海灵

指导教师姓名: 陈建民 副教授

专 业 名 称: 内 科 学

论文提交日期: 2011 年 4 月

论文答辩时间: 2011 年 5 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 5 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()
课题(组)的研究成果,获得()
课题(组)经费或实验室的资助,在()
实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的：明确抑癌基因 ARHI 在人胃癌细胞株及组织标本的表达情况，并统计分析其表达异常与胃癌患者临床病理特征之间的相关性；初步研究 ARHI 基因在胃癌细胞中的功能，从而为更深入的研究和早期胃癌的基因诊断及分子靶向治疗提供新的思路和理论依据。

材料方法：本研究通过收集胃癌手术新鲜标本、石蜡标本及培养不同分化程度胃癌细胞株，利用半定量 RT-PCR，Western-blot，免疫组化，MTT，Transwell 及流式细胞分析术等方法在 mRNA 和蛋白水平，从细胞到人体组织，对胃癌中 ARHI 基因的表达进行多层次多方法的研究验证。同时利用体外培养的 MKN-28 胃癌细胞初步研究了 ARHI 基因在胃癌中的功能。

结果：在细胞层面，从 mRNA 和蛋白水平检测发现，ARHI 基因在不同分化程度的人胃癌细胞系及正常人胃粘膜上皮细胞之间均存在表达差异，ARHI 表达量随细胞分化程度的升高而增加，两种实验方法检测结果基本一致。在组织层面的验证与细胞实验基本一致，即 ARHI 基因在多数胃癌组织标本表达下调或缺失，而在相应正常组织标本相对高表达；ARHI 蛋白表达与肿瘤的分化程度及 TNM 分期有关($P < 0.05$)，而与患者的年龄、性别、肿瘤发生部位、大小、大体类型、是否淋巴结转移等均无明显统计学差异。经 MTT、Transwell 小室以及流式细胞术的方法检测表明，在 MKN-28 高分化胃癌细胞中 ARHI 基因干扰后细胞增殖、迁移及抗凋亡能力均较空载 PU6 质粒的细胞增强。

结论：ARHI 基因在人胃癌中存在表达下调或缺失，其在胃癌中也发挥抑癌基因功能。

关键词： ARHI 基因；胃癌；抑癌基因

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Objective: To investigate the expression of tumor suppressor gene ARHI on human gastric cancer cell lines and tissues and statistical analysis of the correlation between ARHI expression and the clinicopathological characteristics. Preliminary study the functions of ARHI gene on gastric cancer cell lines, so as to further research and genetic diagnosis of early gastric cancer and molecular targeted therapy to provide new ideas and theories.

Materials and Methods: In this study, semi-quantitative RT-PCR, Western-blot, immunohistochemistry, MTT, Transwell technique and flow cytometry analysis methods was used to validate the ARHI gene expression on multi-level and multi-way , from cells to human tissues on mRNA and protein levels in gastric cancer, by collecting fresh gastric surgery specimens, paraffin specimens and cultured gastric cancer cell lines with different degree of differentiation. Furthermore, we preliminary study the functions of the ARHI gene using gastric cancer cell line MKN-28 in vitro.

Results: At cellular level, ARHI gene exist expression differences between different differentiation of human gastric cancer cell lines and normal human gastric epithelial cells, in which detected from the mRNA and protein levels. With the enhance of cell differentiation, ARHI expression is increased and the two methods are basically the same results. Consistent with the cell experiments, detection at the organizational level shows that ARHI gene is downregulated or absent in most gastric cancer tissues and is relatively high expression in corresponding normal tissues. The expression of ARHI protein is not associated with age, gender, tumor location, tumor size or metastasis in patients with gastric cancer. However, the significant correlation between ARHI protein expression and tumor degree of differentiation and TNM stage was observed ($P < 0.05$). To detected by the methods of MTT, Transwell chamber and flow cytometry shows that cell proliferation, migration and anti-apoptotic capacity increased than stable transfected empty plasmid PU6 cells after ARHI gene is disrupted on well-differentiated gastric cancer MKN-28 cells.

Conclusion: The expression of ARHI gene is downregulated or absent in human gastric cancer and it also play a function of tumor suppressor gene.

Key Words: ARHI Gene; Gastric Cancer; Tumor Suppressor Gene

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

中文摘要	I
英文摘要	II
第一章 绪论	1
第二章 ARHI 基因在胃癌细胞株中的表达.....	4
2.1 材料方法	4
2.2 结果	10
2.3 小结	12
第三章 ARHI 基因在人胃癌组织中的表达.....	13
3.1 材料方法	13
3.2 结果	16
3.3 小结	20
第四章 干扰 ARHI 基因表达对胃癌细胞 MKN-28 的影响	22
4.1 材料方法	22
4.2 结果	27
4.3 小结	31
结论和展望	32
参考文献	34
附 录.....	36
文献综述	38
致谢.....	45

厦门大学博士论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English.....	II
Chapter 1 Introduction.....	1
Chapter 2 ARHI gene expression in gastric cancer cell lines.....	4
2.1 Materials and Methods.....	4
2.2 Results.....	10
2.3 Summary.....	12
Chapter 3 ARHI gene expression in gastric cancer tissues.....	13
3.1 Materials and Methods.....	13
3.2 Results.....	16
3.3 Summary.....	20
Chapter 4 The effect of interfering ARHI gene in gastric cancer MKN-28 cell lines.....	22
4.1 Materials and Methods.....	22
4.2 Results.....	27
4.3 Summary.....	31
Conclusion and prospect.....	32
References.....	34
Appendix.....	36
Reviews.....	38
Acknowledgement.....	45

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 绪论

ARHI(aplasia ras homologue member I)基因是 1999 年由美国德克萨斯大学 Anderson 癌症中心的 Yu 等^[1]从人卵巢和乳腺上皮细胞及其癌细胞中克隆出的一个新的肿瘤抑制基因。该基因定位于人染色体 1p31,大约 8kb。ARHI 基因中包括了三个 CpG 岛,它的异常甲基化对该基因的表达产生影响^[2]。ARHI 是 ras/rap 超家族成员之一,与该家族成员有 50%~60%的同源性,编码一个相对分子质量 26kD 的小 GTP 结合蛋白,但却具有较低的 GTP 酶活性。ARHI 基因是一个母源性印迹基因,正常细胞中,母源性的 ARHI 等位基因上发生 CpG 岛甲基化修饰,使其转录活性受到抑制,而父源性的等位基因则无甲基化修饰,从而能够在子代中表达^[3]。

研究发现,ARHI 基因可在人类多种不同的正常组织中表达。Yu^[1]等用 Northern blot 方法检测人的 16 种不同正常组织,ARHI 在心、肝、胰腺及脑组织中均有表达,但正常卵巢组织的 ARHI 表达最高。Lu^[4]等观察到,除胰腺导管、胰腺腺泡上皮及一些癌细胞可见阳性染色外,大部分纤维组织、平滑肌、血管壁以及肠粘膜上皮等均可见阳性着色,提示在正常情况下,ARHI 是一种在多组织中均有表达的基因,说明这种基因有着重要的生物学功能。

ARHI 基因与肿瘤关系的研究相对较少。现有的研究资料提示 ARHI 基因在乳腺癌^[5]、卵巢癌^[1]、胰腺癌^[4,6]等恶性肿瘤中表达下调或缺失。Hisatomi 等^[5]通过检测 ARHI mRNA 在乳腺癌组织中的表达,发现正常乳腺组织中均存在 ARHI 表达,而乳腺癌组织中表达下调或缺失。施宗高等^[7]在 mRNA 水平通过检测乳腺良恶性病变组织,发现 ARHI mRNA 的阳性率在良恶性病变组织中存在显著差异。Feng 等^[8]通过对 40 例卵巢癌患者手术组织标本进行研究发现 ARHI 基因表达缺失率达 88%,进一步研究发现卵巢癌中 ARHI 的低表达与该基因的杂和性丢失及启动子区甲基化有关;Lu 等^[9]研究显示,在卵巢癌中 ARHI 在转录和转录后两个水平的调控,促进其表达明显下调。Dalai 等^[10]运用 RT-PCR 方法研究发现 ARHI 在分化良好型和分化不良型胰腺内分泌瘤中表达差异显著,低表达 ARHI 与胰腺肿瘤的复发和恶性进展密切

相关。Lu X 等^[11]对胰腺癌细胞的研究发现 ARHI 基因的再表达抑制了胰腺癌细胞的增殖，其主要通过调节细胞周期调节蛋白的表达来发挥抑制功能。Huang 等^[12]研究发现肝细胞癌中 ARHI mRNA 和蛋白表达与癌旁正常的肝细胞比较均明显降低，ARHI 过表达可显著抑制 Hep3B 肝癌细胞株的生长和集落的形成。Weber F^[13]等人利用 RT-PCR 分析甲状腺癌细胞株研究表明 ARHI 在滤泡型甲状腺癌中低表达($P=0.0018$)。李勤等^[14]利用 GE7 导入系统介导 ARHI 体内导入治疗人上皮性卵巢癌裸鼠腹水瘤显示一定的疗效，为基因治疗提供了一定的实验基础。上述实验进一步证明该基因在肿瘤的发生、发展中发挥重要的作用。

目前研究认为 ARHI 基因表达失活可能与印迹基因的突变^[15]、杂合性丢失、DNA 甲基化和染色体乙酰化修饰等有关^[16, 17]。而 ARHI 基因的抑癌作用主要是通过以下几条途径完成的：(1)通过依赖需钙蛋白酶(calpain)和凋亡蛋白酶(caspase)两条途径，触发凋亡信号转导，启动凋亡执行器，而诱导细胞自杀身亡^[3]；(2)通过作用于细胞周期的动力蛋白 Cyclin D1 或促使 p21WAF1/CIP1 高表达，从而抑制 CDK 活性，使细胞生长停滞^[18]；(3)与信号转导蛋白和转录激活子 STAT3 相互作用，并通过抑制 STAT3 的激活而发挥抑癌基因功能^[19, 20]；另外，进一步研究发现 ARHI 基因通过抑制核输入因子与 STAT3 的结合而阻碍 STAT3 蛋白的核定位，抑制其转录激活功能^[21]。还有学者通过对卵巢癌细胞的研究提示 ARHI 基因可以诱导自体吞噬细胞的死亡，促进肿瘤细胞休眠^[22, 23]；通过对乳腺癌细胞的研究发现 ARHI 基因重新表达也可诱导自噬细胞的死亡^[24]。

胃癌(gastric cancer)是最常见的恶性肿瘤之一。其发病率为 10~150/10 万，全球每年新发病例数达 875 000，居所有恶性肿瘤的第 2 位^[25]。而全世界约 35%的病例发生在中国，每年我国死于胃癌的患者超过 17 万。中国是胃癌发病率和死亡率最高的国家之一，半数早期胃癌患者无任何症状，诊断率低于 5%。可见对于中国这样一个人口大国，胃癌的基础研究及早期临床诊治显的尤为重要，但目前胃癌发病机制仍不清楚，早期诊断和治疗比率仍很低。

ARHI 基因是 ras/rap 超家族中第一个被报道的抑癌基因，也是第一个在成人肿瘤中发现的母源性抑癌印迹基因。作为一个较特殊的抑癌基因，ARHI 基因在

胃癌中是否存在表达失活？该基因的表达失活与胃癌患者临床病理特征有何相关性？该基因对胃癌细胞增殖、凋亡等功能有何影响？目前国内外尚无相关研究报道。本课题将针对以上问题进行较详细的研究。

厦门大学博硕士论文摘要库

第二章 ARHI 基因在胃癌细胞株中的表达

2.1 材料方法

2.1.1 实验材料

1.细胞

永生化人胃粘膜上皮细胞株 GES-1、人胃癌细胞株 SGC-7901、BGC-823 为本实验室所保存，人胃癌 MKN-28 细胞株购自第四军医大学细胞库。

2.主要试剂

RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基以及胰蛋白酶(Trypsin)均购自美国 Hyclone 公司；小牛血清(FBS)购自 Gibco 公司；Trizol、Lipofectamine TM 2000 Transfection Reagent 以及 OPTI-MEM 均购自 Invitrogen 公司；二甲基亚砜(DMSO)购自上海生物工程有限公司；鼠抗人 ARHI 单克隆抗体购自 Abcam 公司；iScript cDNA 合成试剂盒购自 Bio-Rad 公司；DL 2000 DNA Marker 购自北京索莱宝科技有限公司；2×Taq PCR Green Mix 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司；ProteoJET Mammalian Cell Lysis Reagent 购自 Fermentas 公司；考马斯亮蓝(Bradford)法蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司；Tween-20 购自上海精益化工有限公司；甘氨酸，Tris 试剂购自宝泰克生物工程有限公司；增强型化学发光系统(ECL)为 Pierce 公司产品；显影液、定影液购自碧云天生物技术研究所以；X 光胶片购自柯达公司。

3.主要仪器

Beckman 离心机(JM-6)、Beckman 紫外分光光度计均购自美国 Beckman 公司；BLUEPARD 隔水式培养箱(GHP-9160) 购自上海恒科科学仪器有限公司；水平式琼脂糖凝胶电泳仪及凝胶分析系统(GAS7100X 型)均购自美国 BIO-RAD 公司；PCR 仪(GeneAmp2700 型)购自美国 AppliedBiosystems 公司；台式高速冷冻离心机购自德国 eppendorf 公司；Mini Protean Cell 小型垂直电泳仪购自 Bio-Rad 公司；冰箱(BCD-256H)、冰柜(BC/BD-206)均购自青岛海尔公司；超低温冰箱(925 型)购自美国 Forma 公司；水浴锅(MC02810202)购自天津泰斯特仪器有限公司；电

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库